

# 猕猴桃基因组 DNA 提取方法的研究进展

袁云香, 王志平

(渭南师范学院 环境与生命科学系, 陕西 渭南 714000)

**摘要:**对猕猴桃基因组 DNA 提取的各个环节的进展进行综述。经分析得出,干叶片是一种较为理想的材料,容易保存,获得的基因组 DNA 质量也较高。提取方法主要有 SDS 和 CTAB 法,SDS 法可以较好的将 DNA 与蛋白质分开,而 CTAB 法则可以较好的将基因组 DNA 与糖等杂质分离开;此外还有一些改良的提取基因组 DNA 的方法,都是比较实用的。可以根据不同的条件选取不同的方法。

**关键词:**猕猴桃;基因组 DNA;提取方法;进展

**中图分类号:**S 663.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0195-03

猕猴桃属猕猴桃科猕猴桃属,为多年生藤本落叶植物。我国的猕猴桃资源十分丰富,类型特别多,现阶段主要从分子水平上探讨猕猴桃自然群体的遗传结构与品种鉴定,为猕猴桃的遗传多样性研究提供重要补充和支持。而获取高质量的猕猴桃基因组 DNA 是进行猕猴桃分子生物学研究的前提。由于次生产物如多糖或多酚类化合物等的作用,使得猕猴桃基因组 DNA 的提取较为困难,质量较低,难以满足分子生物学研究的需求<sup>[1-3]</sup>。前人已针对各自研究目的进行了猕猴桃基因组 DNA 提取方法的研究。现对猕猴桃基因组 DNA 提取的各种方法的优缺点及应用范围进行综述。

## 1 猕猴桃样品的取材与保存

对猕猴桃基因组 DNA 的提取可以采用不同的材

料,例如根、茎、叶等。许文平等认为,猕猴桃幼叶经液氮迅速冷冻后进行基因组 DNA 提取获得的基因组 DNA 效果较好,适合于进行文库扩增及 PCR<sup>[4]</sup>。林智华等认为,以猕猴桃组培苗的茎部为材料,得到的猕猴桃基因组 DNA 浓度较高,纯度也较高,适合于进行下游的分子生物学操作<sup>[5]</sup>。李健仔等认为,以猕猴桃干叶片为材料提取的猕猴桃基因组 DNA 质量较为理想,适合于进行 PCR 及其它分子操作<sup>[6]</sup>。此外,利用猕猴桃干叶片进行基因组 DNA 的提取是比较方便的,因为它易获得也易保存,在实验条件不允许或没有新鲜的叶片或茎时,这是一种比较好的方法。样品的不同保存方法对 DNA 完整性也有一定的影响。据研究,-20℃或-70℃冻存及硅胶脱水干样保存与鲜叶中所提取的基因组 DNA 纯度均较高<sup>[7]</sup>。

## 2 缓冲液的提取

针对不同的材料来源和特点,调整设计相应的提取缓冲液及技术方案对基因组 DNA 的提取是很重要的。缓冲液的成分应根据分离对象的不同而变化,缓冲液的 pH、保护剂和表面活性剂都要根据不同样品进行优化。

在猕猴桃基因组 DNA 的提取过程中主要用 2 种缓

**第一作者简介:**袁云香(1980-),女,江西抚州人,硕士,讲师,研究方向为植物分子遗传学。

**基金项目:**陕西省教育厅 2009 年度科学研究计划资助项目(09JK434);渭南师范学院研究生科研基金资助项目(09YKZ002);国家自然科学基金资助项目(31000410)。

**收稿日期:**2011-02-18

充分依托网络信息,推动蔬菜名优品种寒地、果树特色品种的推广工作,提高品牌蔬菜及果品的销售率。依靠网络及时了解国内外市场销售和加工行情,有针对性的进行生产。建立传递快捷的信息服务平台,及时提供生产、市场、供货信息。建立寒地园艺作物的销售产销形势网上专家预测预报制度,为制定指导性计划提供科学依据,及时向生产、加工、流通等各个环节提供科技信息。

## 2.6 加大黑龙江省种植业中经济作物的保险和灾害保障体系建设

借鉴美国、日本、法国等发达国家在长期发展农业保险过程中所完善形成的政府与市场结合、规范法律法规、强制性办理农业保险。建立和完善黑龙江省的经济作物农业保险体系,增加经济作物的生产和销售险种,实现黑龙江省园艺经济作物的稳定和可持续发展,使投保农民成为农业保险的直接受益者。

冲液即 SDS(十二烷基硫酸钠)和 CTAB(溴化十六烷基)。此外,还原型巯基成分如  $\beta$ -巯基乙醇、谷胱甘肽等一些硫醇类物质,通常可用于保护 DNA 免受酚类、多酚氧化酶等物质的损害。另外还有在提取液中加入活性炭、硫代硫酸钠、硼砂等物质防止多酚类物质氧化的报道。

### 3 DNA 的提取

目前提取猕猴桃基因组 DNA 的方法较多,但按裂解剂的不同主要分为 CTAB 法与 SDS 法<sup>[5-7]</sup>。

#### 3.1 传统的 DNA 提取方法

3.1.1 传统的 CTAB 法 传统的 CTAB 法是在裂解细胞的基础上,多次利用苯酚/氯仿等有机溶剂抽提,然后加入异丙醇、乙醇等沉淀 DNA,用 70%乙醇漂洗沉淀,最后用 TE 溶解 DNA 以备。由于 CTAB 能与核酸形成复合物,在低盐浓度下 CTAB-核酸复合物就因溶解度降低而沉淀,而大部分蛋白质及多糖等仍溶解于溶液中,通过抽提去除蛋白、多糖、酚类等杂质后,加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来,再用 70%酒精可洗脱掉 CTAB,即可得到较为纯净的基因组 DNA。

3.1.2 传统的 SDS 法 SDS 在高温(55~65℃)条件下能裂解细胞,可使蛋白质及多糖杂质沉淀更加完全,离心后除去沉淀,上清液中的 DNA 用酚/氯仿反复抽提,再用乙醇沉淀水相中的 DNA 即可。这 2 种传统的提取方法都无需昂贵仪器和药品,其中 SDS 法可以较好的将 DNA 与蛋白质分开,而 CTAB 法则可以较好的将基因组 DNA 与糖等杂质分离开。但这 2 种方法操作步骤复杂,耗时长,易交叉污染,残留在 DNA 溶液中的有机物对 DNA 聚合酶有抑制作用,因此该方法的应用具有一定的局限性。因此,有研究者在传统的猕猴桃基因组 DNA 提取的基础上进行了改良,探索更适用于对猕猴桃基因组 DNA 做下游试验的方法。

#### 3.2 猕猴桃基因组 DNA 提取方法的改进及效果分析

3.2.1 改良的 CTAB 法 方法一:通过增加提取缓冲液中  $\beta$ -巯基乙醇的用量,简化氯仿/异戊醇抽提液的步骤,改用经 -20℃ 预冷的异丙醇沉淀 DNA,对 CTAB 法加以改进<sup>[8]</sup>。改进后操作比较简单、方便,产量高、纯度高,并且在提取过程没有明显的 DNA 降解。基因组 DNA 产物中基本排除了组织中的多酚物质、蛋白质和其它杂质的干扰,用此方法获得的 DNA 进行 Southern 杂交,可获得理想的杂交信号,可满足相关的下游分子研究的要求。方法二:在异丙醇沉淀前加入 1/2 体积的 5 mol/L NaCl 或等体积无水乙醚。对 CTAB 法加以改进<sup>[5]</sup>。加 NaCl 的改良方法获得的基因组 DNA 电泳后亮带完整,基本无拖尾,纯度和得率没有损失,能保持基

因组 DNA 的完整性。而加无水乙醚虽然可以大幅度的提高基因组 DNA 的纯度但得率下降,因此加入 NaCl 的效果较好。方法三:CTAB 提取缓冲液的配置稍有变化,具体的配制如下:2% CTAB, Tris-HCl(pH 8.0)100、NaCl 1.4、偏重亚硫酸钠 20 mmol/L,1% 巯基乙醇<sup>[9]</sup>。用这种改进的 CTAB 法较为简单,所提取的猕猴桃基因组 DNA,干燥时呈透明的白色,溶于缓冲液中无色,说明此改进的 CTAB 法去除色素及次生代谢物的效果好,而且 DNA 降解少, RAPD 带型清晰,重复性好。方法四:同时改变提取液中 EDTA 和  $\beta$ -巯基乙醇的浓度,探究 EDTA 和巯基乙醇对提取 DNA 的影响及最佳提取条件<sup>[10]</sup>。结果表明:提取液中 EDTA 的浓度在 40 mmol/L 以上,在提取猕猴桃基因组 DNA 时效果较佳。基因组提取液中加 20 mmol/L EDTA 时,与之相匹配的巯基乙醇浓度是 4%、5%;加 40 mmol/L EDTA,无论加不加巯基乙醇,基因组 DNA 都稍微降解。

3.2.2 改良的 SDS 法 SDS 提取缓冲液稍有变化,具体配制如下:2% SDS, Tris-HCl(pH 8.5)100、EDTA (pH 8.0)20、NaCl 100 mmol/L,3% PVP(聚乙烯吡咯烷酮),0.1%偏重亚硫酸钠,充分混匀。用此改进的 SDS 法简便,纯度和得率高,质量也较好,能直接用于 PCR 扩增。提取的 DNA 完整性好,可直接用于限制性内切酶酶切和随机扩增多态 DNA 反应。同时该提取法使用酚类物质的结合剂 PVP 和抗氧化作用的偏重亚硫酸钠,有效防止了多酚物质氧化成醌类。

### 4 DNA 纯化及杂质去除

#### 4.1 酚类杂质的去除

在提取 DNA 过程中加入巯基乙醇、半胱氨酸等巯基试剂,抑制氧化反应,避免褐化。在样品液氮研磨及提取缓冲液中加入高分子螯合剂 PVP 等能络合多酚和萜类物质离心或氯仿抽提出去,有效的防止多酚物质氧化成醌类,避免溶液变褐而具有抗氧化作用。因此将 PVP 和巯基乙醇配合使用并调整用量,能够有效地防止多酚污染。

#### 4.2 多糖类杂质的去除

猕猴桃组织中富含多糖,很难与 DNA 分开<sup>[11]</sup>。经典的 CsCl 梯度离心能有效的除去植物中多糖,但梯度离心设备昂贵,操作不便且 DNA 得率很低。近年国内外一些去除多糖的相关报道, Dellaporta 等认为加入高浓度的 KAc 有利于除去多糖<sup>[1]</sup>; Fang 等认为在高盐 TE 中,用无水乙醇沉淀 DNA 能除去多糖<sup>[12]</sup>; SuePorebski 等将 NaCl 的浓度提高至 2.5 mol/L 以除去多糖<sup>[13]</sup>;徐志祥等将 DNA 沉淀重悬于 30%乙醇中 4℃ 放置过夜,能去除多糖和其它杂质<sup>[14]</sup>;程运江等用乙醚和 NaCl 溶

液能将大部分多糖去除; AnMichiels 等用黄化叶提取 DNA 能有效地防止多糖污染; 陈大明等利用细胞区室化多酚类以及其它杂质与 DNA 相互隔离的特性, 在裂解细胞前用不含 CTAB 的提取缓冲液去除细胞质中大多数生化成分, 同时高效地防止多酚类物质被氧化, 从而达到排除多酚类等杂质干扰的目的<sup>[15-18]</sup>。

## 5 小结

通过对猕猴桃基因组 DNA 的提取材料、提取缓冲液、以及提取方法的比较分析可以看出, 在取材方面幼叶中提取的基因组 DNA 比较适合于进行 PCR, 而干叶片则是一种较为理想的材料, 尤其在取材较为困难时, 它容易保存, 并且获得的基因组 DNA 质量也较高, 适合于进行下游的分子操作。对于 CTAB 和 SDS 这 2 种缓冲液来说各有各的优点, SDS 可以较好的将 DNA 与蛋白质分开, 而 CTAB 则可以较好的将基因组 DNA 与糖等杂质分离开。因此, 在提取猕猴桃基因组 DNA 时要充分考虑到是否会影响下游操作而选取适当的缓冲液。在具体的提取方法上可以考虑适当增加  $\beta$ -巯基乙醇的用量, 或加入 NaCl 或等体积无水乙醚, 或改变 EDTA 浓度来获取高质量的基因组 DNA。

## 参考文献

- [1] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep preparation Version[J]. Plant Molecular. Biology. Report, 1983, 1(4): 19-21.
- [2] Honeycutt R J P, Keim J, Irvine J E. A DNA rapid extraction method of sugarcane and relatives[J]. Plant Molecular. Biology Report, 1992, 10(1): 66-77.
- [3] 宣朴, 徐利远, 余桂容. 植物 DNA 快速高效提取方法的研究[J]. 西南农业学报, 1998, 11(2): 111-114.
- [4] 许文平, 徐昌杰, 陈昆松, 等. 猕猴桃基因组 DNA 文库的构建[J]. 果树学报, 2004, 21(3): 204-207.
- [5] 林智华, 林程忠, 梁红, 等. 猕猴桃基因组 DNA 提取的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 996-998.
- [6] 李健仔, 李思光, 罗玉萍. 猕猴桃干叶片 DNA 的提取及叶绿体基因 PCR-RFLP 反应[J]. 生物技术, 2003, 13(3): 10-11.
- [7] 徐小彪, 陈华, 张秋明. 样品不同保存方法对猕猴桃总 DNA 提取效果的影响[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 321-328.
- [8] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- [9] 路文鹏, 李昌禹, 康玉荣. 几种东北果树 DNA 提取及 RAPD 鉴定[J]. 特产研究, 2006(4): 26-28.
- [10] 陶爱丽, 文祯中, 阙云超, 等. 美味猕猴桃基因组 DNA 的提取条件优化[J]. 南阳师范学院学报, 2004, 3(9): 56-58.
- [11] Shiodam M, Marakami M K. Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*[J]. Biochem Biophys. Res. Commun., 1987, 146: 61-66.
- [12] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for re-moving polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Biofeedback, 1992, 13(1): 52-54.
- [13] Porebski S, Bailey L G, Bernard R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reports, 1997, 15(1): 8-15.
- [14] 徐志祥, 程度, 李宝健. 灰树花总 DNA 的制备及基因组文库的构建[J]. 遗传, 2004, 26(5): 711-713.
- [15] 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 621-624.
- [16] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 等. 几种木本果树 DNA 的有效提取[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481-483.
- [17] Michiel S A, Ende W V, Tucker A M, et al. Extraction of high-quality-genomic DNA from latex-containing plants[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 315: 85-89.
- [18] 易庆平, 罗正荣, 张青林. 植物总基因组 DNA 提取纯化方法综述[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(25): 7789-7791.

## The Progress of Extract Method of Kiwifruit Genomic DNA

YUAN Yun-xiang, WANG Zhi-ping

(Department of Environment and Life Sciences, Weinan Teachers University, Weinan, Shaanxi 714000)

**Abstract:** The extract method of kiwifruit genomic DNA were summarized in this paper. The results showed that the dried leaves was an ideal material, it was easy to be preserved, and could get the DNA with high quality. There were two extraction methods, SDS and CTAB. The method of SDS could separate DNA and protein better, but the method of CTAB could separate DNA and sugar and other impurities better. There were also some improvements in the extraction of genomic DNA, the methods were all useful. We could select according to different conditions in different ways.

**Key words:** kiwifruit; genomic DNA; extract method; research progress